

ГЕНОМНЫЙ И ПРОТЕОМНЫЙ ПРОФИЛИ ШТАММОВ
Acholeplasma laidlawii, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ
ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ

© 2016 г. Е. С. Медведева, М. Н. Давыдова, А. А. Музыкантов, Н. Б. Баранова,
Т. Ю. Григорьева, М. Н. Синягина, Е. А. Булыгина, О. А. Чернова, В. М. Чернов

Представлено академиком РАН И.А. Тарчевским 05.08.2015 г.

Поступило 30.09.2015 г.

Впервые проведен сравнительный анализ полных геномов, а также клеточных и везикулярных протеомов штаммов *A. laidlawii*, различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину. Показано, что штаммы микоплазмы с разной чувствительностью к антибиотику имеют множественные различия в геномном и протеомном профилях, имеющие отношения ко многим генам и белкам, вовлеченным в фундаментальные клеточные процессы.

DOI: 10.7868/S0869565216020274

Микоплазменная контаминация — бич клеточных культур всех типов, ведущих свое происхождение от млекопитающих, птиц, рептилий, рыб, насекомых, растений и других эукариотических организмов [1, 2]. Элиминация контаминантов представляет серьезную проблему как для фундаментальных исследований, так и практических работ, связанных с клеточными технологиями и биотехнологическим производством [1]. Микоплазмы быстро адаптируются к стрессовым условиям и оперативно развивают устойчивость к антибактериальным препаратам, однако антибиотикотерапия, связанная с применением фторхинолонов (энрофлоксацин, спарфлоксацин и ципрофлоксацин), в том числе в сочетании с макролидами и/или препаратами тетрациклиновой группы, остается пока единственным способом, рекомендуемым для подавления микоплазм [2]. Решение проблемы микоплазменной деконтаминации связывают с определением молекулярных основ формирования устойчивости бактерий к антибиотикам [1, 2].

Реализация геномных проектов и внедрение постгеномных технологий открыли принципиально новые возможности для выявления бактериальных резистомов — совокупности генов и их продуктов, которые вовлечены в формирование устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам [3]. Установление важной роли внеклеточных везикул в соответствующих

процессах определило необходимость исследований как клеточной компоненты бактериального резистома, так и везикулярной [1]. Сведения по резистомам ряда бактерий, основанные на геномных и протеомных данных различающихся по чувствительности к антибиотикам штаммов микроорганизмов, уже имеются в базах данных [3–5]. В отношении микоплазм подобные сведения пока отсутствуют.

Сравнительный анализ полных геномов, а также клеточных и везикулярных протеомов штаммов *A. laidlawii*, различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину, — цель нашего исследования.

В работе использовали штамм *Acholeplasma laidlawii* PG8, полученный из коллекции микроорганизмов ФГБУ “ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи” Минздрава России. Культуру клеток *A. laidlawii* PG8 после музейного хранения выращивали при 37°C в жидкой питательной среде Эдварда (ПСЭ) с модификациями [6]. Резистентный к ципрофлоксацину штамм *A. laidlawii* PG8R₁₀ получали последовательным пересевом культуры микоплазмы в ПСЭ с возрастающей концентрацией этого антибиотика. Чувствительный к ципрофлоксацину штамм *A. laidlawii* PG8S получали селекцией клонов, имеющих значение минимальной ингибирующей концентрации ниже лабораторного штамма *A. laidlawii* PG8. Резистентный к ципрофлоксацину штамм *A. laidlawii* PG8R₁₀ выращивали при 37°C в ПСЭ, содержащей антибиотик в концентрации 10 мкг/мл.

Выделение экстраклеточных везикул (ЭВ) из культуры микоплазмы (логарифмическая фаза роста), ДНК из клеток и ЭВ микоплазмы, а также

Казанский институт биохимии и биофизики
Казанского научного центра
Российской Академии наук
E-mail: elena-med@list.ru

Казанский (Приволжский) федеральный университет

контроль чистоты препаратов (отсутствие клеток в образцах везикул микоплазмы) осуществляли, как описано [6]. До экстракции нуклеиновых кислот образцы клеток и ЭВ микоплазмы обрабатывали ДНК-азой I и РНК-азой (37°C, 30 мин). Трансмиссивную электронную микроскопию проводили согласно [6].

Полногеномное секвенирование штаммов *A. laidlawii* осуществляли на ДНК-секвенаторе GS Junior ("Roche Diagnostics", Швейцария). Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Sequencing Analysis 5.3.1 ("Applied Biosystems", США), а также с использованием базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information). Сборку ДНК-последовательностей de novo выполняли с помощью программного пакета Newbler ("Roche Diagnostics"), выравнивание нуклеотидных последовательностей – Bowtie2 (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml>), поиск и аннотацию однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) – Samtools (<http://samtools.sourceforge.net/mpileup.shtml>) и SnpEff (<http://snpeff.sourceforge.net/SnpEff.html>) соответственно.

Трипсинолиз клеточных и везикулярных белков проводили в растворе и анализировали с помощью хромато-масс-спектрометрии (LC-ESI-MS/MS) согласно [7]. Идентификацию белков осуществляли с помощью программы Mascot MS/MS Ions Search. Классификацию идентифицированных белков проводили в соответствии с функциональными категориями COG (www.ncbi.nlm.nih.gov/COG).

Сравнительная геномика микроорганизмов, связанная с реализацией метагеномных проектов и полногеномным анализом, вскрыла неожиданно высокий уровень пластичности бактериального генома [3]. Установлено, что адаптация бактерий к стрессорам может сопровождаться множественными мутациями. В этом отношении микоплазмы, как оказалось, не составляют исключения. Полученные нами данные свидетельствуют о существенных различиях геномов штаммов *A. laidlawii* с дифференциальной чувствительностью к ципрофлоксацину. В результате определения полных нуклеотидных последовательностей ДНК *A. laidlawii* PG8, PG8R₁₀, PG8S и последующего сравнительного анализа геномов нами были выявлены различия в профилях штаммов, касающиеся как кодирующей, так и не кодирующей части генома, обусловленные инсерциями, делециями и заменами, в том числе несинонимическими, определяющими замену аминокислот в кодируемом геномном продукте. В геноме штамма PG8R₁₀ нами было выявлено 189 значимых замен родительского исходного родительского штамма PG8, 13 из которых определяют появление стоп-кодона, 7 – его потерю и 1 – появление старт-кодона. У PG8S были обнаружены 192 значимые замены относительно исходного родительского, 11 из которых

определяют появление стоп-кодона, 9 – его потерю и 1 – появление старт-кодона. При этом несинонимические замены были установлены не только в генах-мишенях для фторхинолонов (ДНК-гираза и ДНК-топоизомераза), но и других генах, кодирующих также факторы бактериальной вирулентности. Некоторые из этих генов (*trx* – тиоредоксинредуктаза, *cls* – фосфатидилсерин/фосфатидилглицерофосфатсинтаза, *rpoB* – β -субъединица РНК-полимеразы, *pdhA* – α -субъединица пируватдегидрогеназы E1, *mutS* – белок MutS репарации ошибок спаривания ДНК) ассоциированы также с резисторами других микроорганизмов [4, 5]. При этом количество замен в геномах штаммов PG8R₁₀ и PG8S (0.14 SNP/1000 п.н.) не превышает соответствующие показатели у других бактерий (например, 0.24–0.67 SNP/1000 п.н. у штаммов *Acinetobacter baumannii*) [5, 8]. Эти результаты оказались весьма неожиданными. Микоплазмы относят к тахителичным бактериям и быструю адаптацию к стрессорам связывают с высоким мутационным уровнем у этих организмов [2]. Полученные нами данные свидетельствуют не в пользу этого предположения. Быстрая адаптация *A. laidlawii* к антибактериальным препаратам, вероятно, связана с оперативной модуляцией экспрессии генов, определяющей изменение протеомного профиля и, соответственно, реорганизацию клеточных процессов у микоплазмы.

В результате глобального протеомного профилирования при использовании хромато-масс-спектрометрии нами было установлено, что протеомы клеток и везикул штаммов PG8, PG8R₁₀ и PG8S имеют существенные различия. Так, у штамма PG8R₁₀ нами были идентифицированы 64 белка, которые не экспрессировались у PG8, и 56 – у PG8S. У штамма PG8S мы идентифицировали 306 белков, не экспрессированных у PG8 и PG8R₁₀. Особый интерес представляют белки штамма PG8R₁₀, экспрессия которых отсутствует в клетках и PG8S, и PG8. Всего мы обнаружили 26 таких белков, некоторые из них (хоризматмутаза, тиоредоксинредуктаза, белок сопряжения транскрипции–репарации, Zn-зависимая пептидаза, белок семейства нитроредуктаз, пептидилпролил-цис-транс-изомераза циклофилинового типа, белок *mutS2*, белок J, индуцируемый при повреждении ДНК) также ассоциированы с резисторами других бактерий [9, 10]. Согласно COG, эти белки участвуют в фундаментальных клеточных процессах: образовании энергии, в транскрипции, репликации, рекомбинации, репарации, фолдинге белков, защитных механизмах, транспорте и метаболизме аминокислот, нуклеотидов, липидов, углеводов, неорганических ионов, а также реализации вирулентности (Zn-зависимая пептидаза, пептидилпролил-цис-транс-изомераза циклофилинового типа, хоризматмутаза).

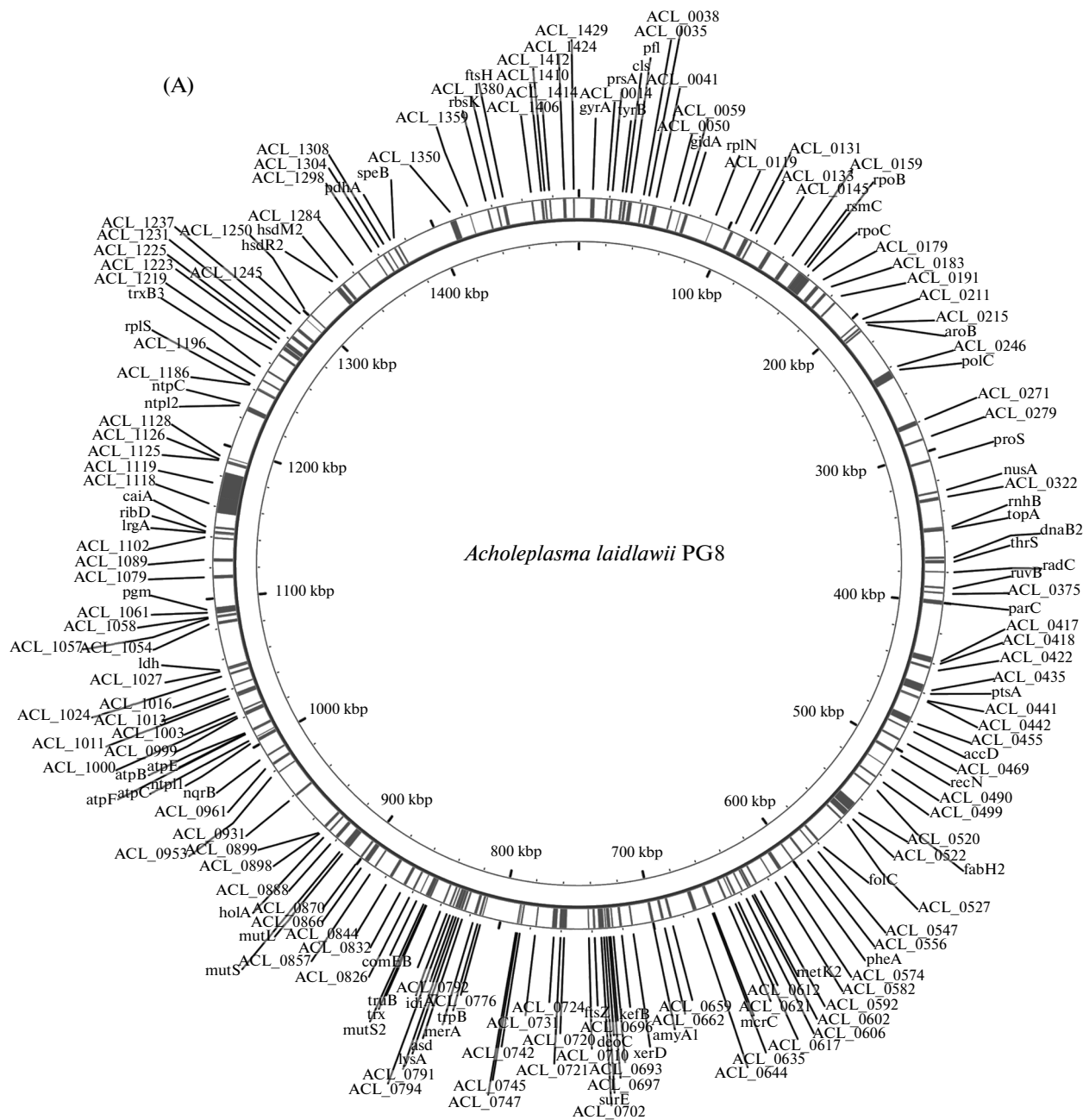


Рис. 1. Локализация генов, первичная структура которых у *A. laidlawii* PG8 и *A. laidlawii* PG8R₁₀ различается (А), и генов белков, дифференциально экспрессируемых у соответствующих штаммов (Б), на геномной карте микоплазмы. (*) – гены белков, идентифицированные в экстраклеточных везикулах только *A. laidlawii* PG8R₁₀. Графическое изображение хромосомы получено с помощью GCView Server (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/index.html)

Модуляция бактериального протеома может в значительной мере определять изменение секрета, ассоциированного с экстраклеточными везикулами [11]. Закономерности ассоциации секрета бактериальных штаммов с разной чувствительностью к антибиотикам представляют значительный интерес как для фундаментальных, так и прикладных работ. Однако подобные данные получены пока только при исследовании грамотрицательной бактерии *Pseudomonas aeruginosa* [11].

Полученные нами в результате пошаговой селекции штаммы *A. laidlawii* PG8R₁₀ и PG8S, обладающие соответственно повышенной устойчивостью и чувствительностью к ципрофлоксацину, и исходный родительский штамм микоплазмы PG8 различаются по уровню везикуляции, а также по размерам продуцируемых везикул. Клетки штаммов PG8 и PG8S секретируют везикулы диаметром 30–110 и 75–115 нм соответственно, но уровень везикуляции у них достоверно не различает-

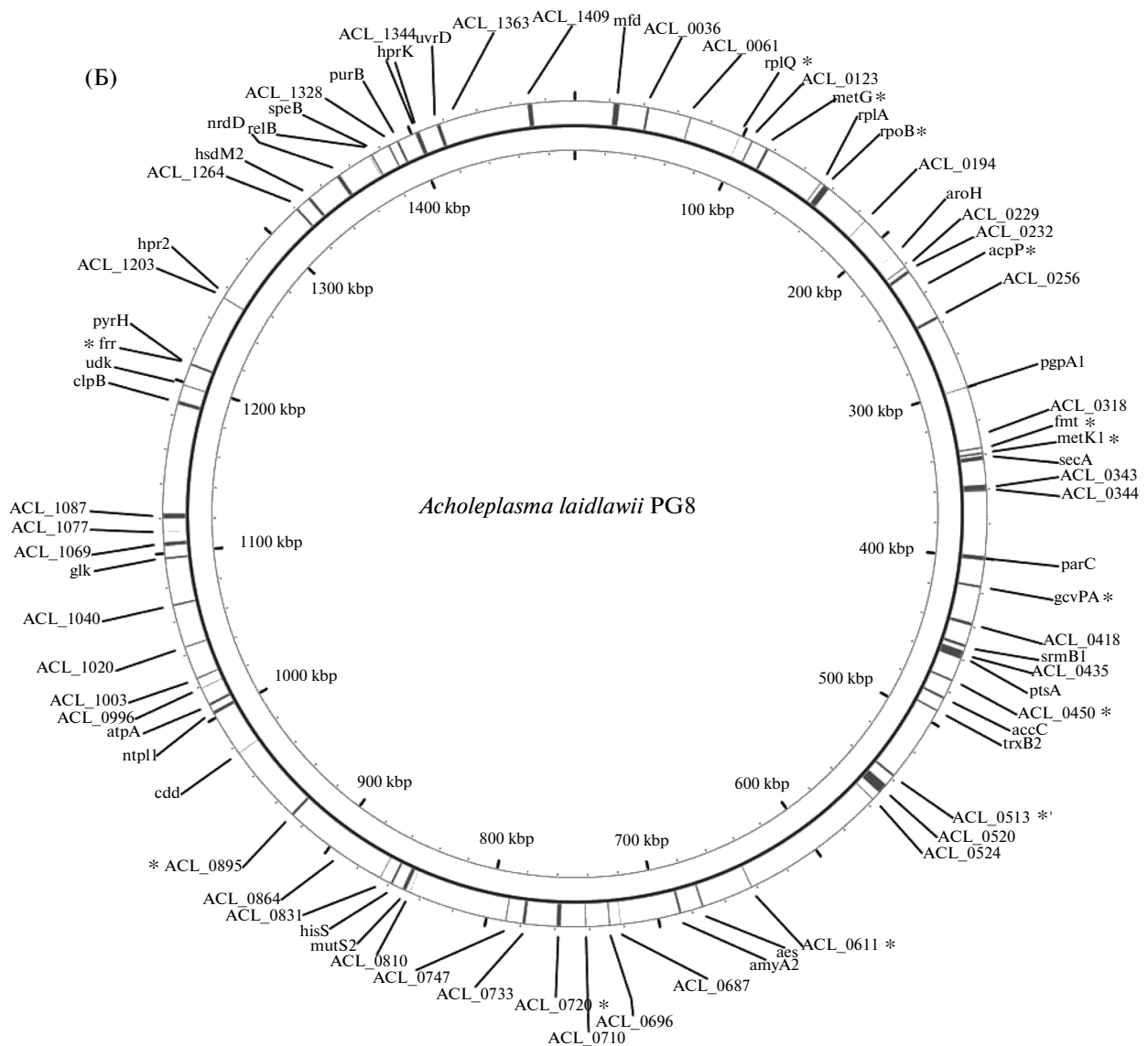


Рис. 1. Продолжение.

ся, тогда как у штамма PG8R₁₀ наблюдается повышенный уровень везикуляции, а диаметр продуцируемых везикул равен 70–115 нм. В результате полного протеомного профилирования везикул при использовании хромато-масс-спектрометрии нами были идентифицированы белки везикул, продуцируемых клетками *A. laidlawii* PG8, PG8R₁₀ и PG8S. Обнаружено, что протеомы экстракционных везикул штаммов с разной чувствительностью к ципрофлоксацину существенно различаются. В составе везикул штамма PG8R₁₀ мы обнаружили 17 белков, в отличие от 97 у PG8 и 78 у PG8S, из которых только 4 (енолаза, фосфоглицераткиназа, УДФ-глюкоза-пирофосфорилаза, фактор элонгации Tu) присутствуют у штамма PG8, и 7 (енолаза, фосфоглицераткиназа, УДФ-глюкоза-

пирофосфорилаза, фактор элонгации Tu, β-субъединица РНК-полимеразы, SomEC-подобный белок компетенции, пептидаза семейства U35) – у штамма PG8S. Согласно COG, везикулярные белки штамма PG8R₁₀ участвуют в фундаментальных клеточных процессах: транскрипции, трансляции, транспорте и метаболизме аминокислот, липидов, углеводов, коэнзимов, неорганических ионов, вторичных метаболитов, биогенезе мембран, а также патогенезе бактериальной инфекции (енолаза, пептидаза семейства U35, фактор элонгации Tu, фосфоглицераткиназа). Особый интерес представляют пептидаза семейства U35 и SomEC-подобный белок компетенции, которые обнаруживаются в везикулах PG8R₁₀ и PG8S, но не выявляются у родительского штамма. Эти бел-

ки участвуют в генетической трансформации микроорганизмов, ассоциированной с горизонтальным переносом генов, существенным для адаптации бактерий к стрессорам, формирования резистентности к антибиотикам и вирулентности [12, 13]. В этой связи особый интерес для понимания механизмов быстрой адаптации бактерий к стрессорам, в том числе к действию антибактериальных препаратов, представляют сравнительные исследования компетентности штаммов, имеющих разную чувствительность к антибиотикам, и участие в ней секретома, ассоциированного с экстраклеточными везикулами [14]. Данных о проведении таких исследований в доступной литературе мы не обнаружили.

Часть белков *A. laidlawii*, с которыми связаны различия в профилях клеточного и везикулярного протеомов штаммов PG8R₁₀ и PG8S, являются продуктами генов, в первичной структуре которых нами были выявлены мутации (рис. 1). Связь особенностей модуляции экспрессии соответствующих белков с изменениями структуры кодирующих их генов, а также горизонтальным переносом мутантных генов еще предстоит исследовать. Вместе с тем очевидно, что для понимания причины существенных различий протеомного профиля у бактериальных штаммов с дифференциальной чувствительностью к антибиотику потребуются проведение эпигенетического анализа.

Таким образом, в результате наших исследований впервые проведен сравнительный анализ полных геномов, а также клеточных и везикулярных протеомов штаммов *A. laidlawii*, различающихся по чувствительности к ципрофлоксацину, и показано, что штаммы микоплазмы с разной чувствительностью к антибиотику имеют множественные различия в геномном и протеомном профилях, имеющие отношения не только к мишеням ципрофлоксацина, но и ко многим другим генам и белкам, вовлеченным в фундаментальные клеточные процессы. Выявленные нами множественные изменения в геноме и протеоме устойчивого к ципрофлоксацину штамма *A. laidlawii* могут свидетельствовать о том, что адаптация микоплазмы к фторхинолонам связана с существенной перестройкой биохимических процессов клетки, определяющих механизмы бактериального инфицирования и горизонтальный перенос факторов вирулентности в бактериальной популяции. Это диктует необходимость проведения специальных исследований патогенности различающихся по

чувствительности к фторхинолонам штаммов бактерий и коррекции системы контроля инфектов.

Авторы выражают благодарность научному сотруднику лаборатории молекулярных основ патогенеза КИББ КазНЦ РАН, к.б.н. Г.Ф. Шаймардановой за помощь в проведении трансмиссивной электронной микроскопии, а также сотрудникам Междисциплинарного центра протеомных исследований КФУ, к.б.н. И.И. Салафутдинову и аспиранту А.В. Лайкову за помощь в проведении идентификации белков на масс-спектрометре.

Работа поддержана грантами РФФИ 14–04–00883, 15–44–02594 и грантом “Государственная поддержка ведущих научных школ Российской Федерации” (№ НШ-1890.2014.4). В исследовании использовали оборудование Междисциплинарного центра коллективного пользования Казанского федерального университета при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (ID RFMEFI59414X0003).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернов В.М., Чернова О.А., Санчес-Вега Х.Т. и др. // *Acta Naturae*. 2014. Т. 6. С. 43–54.
2. *Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis* / G.F. Browning, C. Citti Eds L.: Caister Acad. Press, 2014. 350 p.
3. Wright G.D. // *Expert. Opin. Drug. Discov.* 2010. V. 5. P. 779–788.
4. Peleg A.Y., Miyakis S., Ward D.V., et al. // *PLoS One*. 2012. V. 7. e28316.
5. Liu F., Zhu Y., Yi Y., et al. // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. 1163.
6. Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., et al. // *J. Proteomics*. 2014. V. 110. P. 117–128.
7. Lazarev V.N., Levitskii S.A., Basovskii Y.I., et al. // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 4943–4953.
8. Liu W., Xiao S., Li M., et al. // *BMC Genomics*. 2013. V. 14. 80.
9. Han J., Sahin O., Barton Y.W., et al. // *PLoS Pathog.* 2008. V. 4. № 6. e1000083.
10. Lu J., Vlamis-Gardikas A., Kandasamy K., et al. // *FASEB J.* 2013. V. 27. P. 1394–1403.
11. Park A.J., Surette M.D., Khursigara C.M. // *Front Microbiol.* 2014. V. 5. P. 464.
12. Garneau J.E., Tremblay D.M., Moineau S. // *Virology*. 2008. V. 373. P. 298–309.
13. Charpentier X., Kay E., Schneider D., et al. // *J. Bacteriol.* 2011. V. 193. P. 1114–1121.
14. Slager J., Kjos M., Attaiech L., et al. // *Cell*. 2014. V. 157. P. 395–406.